

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

Endosimbiontska teorija o porijeklu eukariota

Endosymbiotic theory on the origin of eukaryotes

SEMINARSKI RAD

Matej Nemčić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2017.

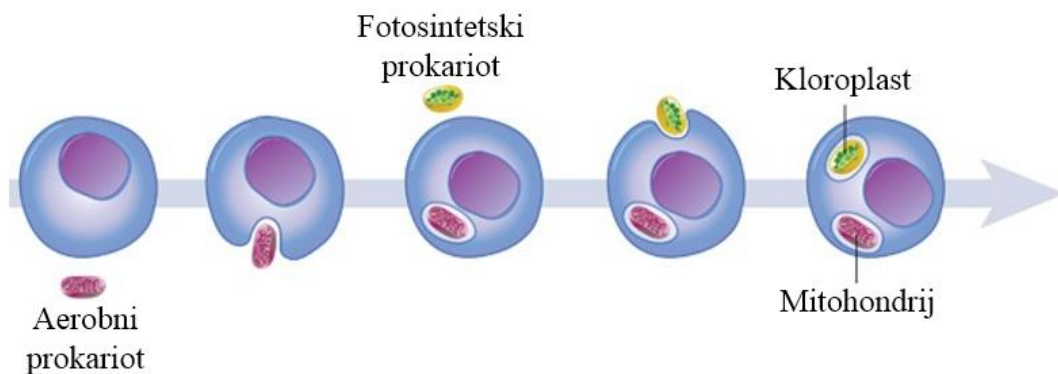
SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. RAZVOJ ENDOSIMBIONTSKE TEORIJE.....	2
3. MITOHONDRIJ I PORIJEKLO EUKARIOTSKIH OBILJEŽJA	4
4. ENDOSIMBIONTSKI PRIJENOS GENA I POSTANAK JEZGRE.....	8
5. PLASTIDI I SEKUNDARNA ENDOSIMBIOZA	11
6. GENOMI ORGANELA I USMJERAVANJE PROTEINA U ORGANELE	14
7. ZAKLJUČAK	15
8. LITERATURA.....	16
9. SAŽETAK.....	20
10. SUMMARY	21

1. UVOD

Pitanje postanka eukariotske stanice jedno je od najvažnijih pitanja u evoluciji kompleksnog života. O tome svjedoči i izuzetan broj objavljenih radova koji pokušavaju dati odgovor na tu temu. Eukariotsku stanicu od prokariotske razlikuje velik broj obilježja kao što su sustav endomembrana, Golgijevo tijelo, endoplazmatski retikulum, postojanje organela i jezgre, stanični ciklus koji uključuje mitozu i/ili mejozu te ostala mnogobrojna obilježja. Teorija koja je trenutno najuspješnija u potrazi za porijeklom eukariotske stanice te postankom eukariotskih obilježja je teorija endosimbioze.

Teorija endosimbioze jest skup hipoteza koje postuliraju da su eukariotski organeli, preciznije mitohondriji i plastidi prokariotskog porijekla. Stanični organeli nastali su kao posljedica simbioze između jednostaničnih prokariota iz kojih se kasnije razvio mitohondrij, odnosno plastid, a moguće i drugi organeli te domaćina koji je na određeni način navedene prokariote 'uzeo' u svoj citosol (Slika 1.). Način i razlog iz kojeg su predak mitohondrija i predak plastida ušli u domaćinsku stanicu još uvijek su predmet rasprave, kao i značajan broj drugih pitanja koji prate endosimbiontsku teoriju.



Slika 1. Shema endosimbiontske teorije. Prilagođeno prema <https://www.nature.com/scitable/content/the-origin-of-mitochondria-and-chloroplasts-14747702>

Endosimbiontska teorija vuče svoje korijene još s početka 20. stoljeća, točnije iz 1905. godine kada je ruski botaničar Konstantin Mereschkovsky proučavajući plastide došao do zaključka da su navedeni organeli reducirani oblici cijanobakterija koje su ušle u simbiotski odnos sa heterotrofnim domaćinom. U to vrijeme teorija je odbačena te nije zaživjela sve do 1967. godine kada ju u središte pozornosti ponovno stavlja Lynn Sagan (kasnije Margulis), o čemu će biti riječi u daljnjim poglavljima rada.

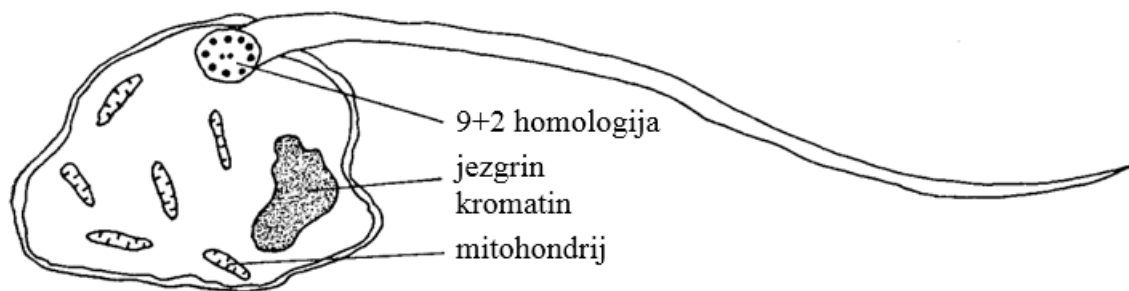
U ovom radu ću dati kratak pregled razvoja endosimbiontske teorije te ukratko predstaviti najsnažnije argumente endosimbiontske teorije koji uz porijeklo plastida i mitohondrija uspijevaju objasniti neka bitna pitanja vezana uz endosimbiozu, a to su svakako pitanje postanka jezgre, porijeklo domaćinske stanice, postojanje složenih plastida, pojava anaerobnih eukariota i drugo. Anaerobni prokarioti su specifični po tome što se kod njih javljaju strukture mitohondrijskog porijekla kao što su hidrogenosomi i mitosomi. Hidrogenosomi su anaerobni oblici mitohondrija okruženi dvostrukom membranom, sintetiziraju ATP putem fermentacije, a kao nusprodukt reakcije nastaje molekularni vodik (prema čemu su dobili i ime). U njima izostaju citokromi, lanac prijenosa elektrona i genom. Mitosomi su organeli derivirani iz mitohondrija koji su izgubili sposobnost proizvodnje ATP-a, a njihova funkcija do sada nije detaljno opisana. Navedene strukture predstavljaju znatne probleme za većinu endosimbiontskih teorija koje ne uspijevaju objasniti njihov postanak, dok neke teorije niti ne prihvaćaju da su hidrogenosomi i mitosomi mitohondrijskog porijekla.

2. RAZVOJ ENDOSIMBIONTSKE TEORIJE

Kao što je već ranije spomenuto, prva formulacija endosimbiontske teorije pripisuje se ruskom botaničaru K. Mereschkovskyju. U svome radu iz 1905. godine, koji su Martin i Kowallik 1999. godine preveli na engleski jezik, rekao je tri ključne stvari: da su plastidi reducirane cijanobakterije koje su rano tijekom evolucije ušle u simbiozu sa heterotrofnim domaćinom, da je navedeni domaćin sam porijeklom rezultat ranije simbioze između heterotrofne ameboidne stanice i manjeg 'mikrokokalnog' endosimbionta iz kojeg je nastala jezgra te da je fotosinteza u biljaka u potpunosti naslijeđena od cijanobakterija (Martin i Kowallik, 1999). Međutim nije uzeo u obzir da bi i mitohondriji mogli biti prokariotskog porijekla. Ideju da bi mitohondriji mogli biti rezultat endosimbioze predstavio je 1918. godine

francuski biolog Paul Portier u svom radu, originalno napisanom na francuskom jeziku, koji je do sada ostao nepreveden. Kao što je Archibald već sažeo u svojoj knjizi, Portier je smatrao da postoji povezanost između mitohondrija i bakterija, ali je i predložio da bi se mitohondriji mogli uzgajati izvan domaćinske stanice, zbog čega je oštro osuđivan (Archibald, 2014). Na njegova razmišljanja nadovezuje se američki biolog Ivan Wallin koji dalje razvija endosimbiontsku teoriju za mitohondrije, tvrdeći da mitohondriji vuku porijeklo od endosimbiontskih bakterija, ali je kao i Portier smatrao da je moguće uzgajati mitohondrije izvan stanica (Wallin, 1927). U svom radu Wallin se bavio i jednim bitnim pitanjem endosimbioze; naime on je već tada pretpostavio da se dio gena iz bakterijskog simbionta pod određenim okolnostima prenosi i ugrađuje u kromosom domaćina (Wallin, 1925).

Unatoč razradama i detaljnijim formulacijama, endosimbiontska teorija u to vrijeme nailazi na značajan otpor te silazi sa scene velik dio 20. stoljeća. Tek 1967. godine Lynn Sagan (kasnije Margulis) formulira prvu obrazloženu verziju endosimbiontske teorije, tvrdeći da su organeli (mitohondriji i kloroplasti) prokariotskog porijekla te da potječu od različitih endosimbionata (Sagan, 1967), čime ju vraća natrag u središte pozornosti i daje joj glavnu ulogu u potrazi za odgovorom na pitanje porijekla eukariotske stanice. U svojoj hipotezi, Sagan za domaćina mitohondrija predlaže heterotrofnog anaerobnog prokariota bez stanične stijenke, sličnog *Mycoplasmi*, koji je u svoju citoplazmu uzeo aerobnu bakteriju te time postao aerobni ameboidni organizam. U radu ide i korak dalje te pomoću endosimbioze pokušava objasniti porijeklo eukariotskog bića, tvrdeći da navedeni ameboidni organizam ulazi u simbiozu sa spirohetom iz čega kao rezultat evoluirao ancestralni eukariot (Slika 2.) sa jezgrom i eukariotskim bićem (homologija 9+2). Na temelju raznolikosti staničnih struktura prisutnih u algama te raznolikosti samih organizama, postanak plastida opisuje kao nekoliko neovisnih događaja ingestije fotosintetskih prokariota tijekom evolucije eumitoze (Sagan, 1967). U kasnijim radovima mijenja redoslijed navedenih događaja te uzima u obzir i otkriće Carla Woesea i njegovih suradnika – arheja. Margulis 2000. godine predstavlja modificiranu teoriju kojim objašnjava porijeklo jezgre navodeći da je došlo do endosimbioze između spirohete i arhebakterije koja ne posjeduje staničnu stijenku (slične *Thermoplasm*), čime je nastao amitohondrijalni eukariot s bićem i jezgrom (Margulis i sur. 2000). Njena teorija o eukariotskom flagelumu nije prihvaćena iz razloga što bić ne sadrži molekulu DNA te na mikroskopskoj razini ne pokazuje sličnosti niti s arhejama ni bakterijama, zbog čega je Margulis kritizirana od strane znanstvene zajednice te nadalje ostaje na margini razvoja endosimbiontske teorije.



ANCESTRALNI EUKARIOT

Slika 2. Ancestralni eukariot prema Lynn Sagan. Preuzeto i prilagođeno iz Sagan (1967). Napomena: homologija 9+2 se odnosi na bazalna tjelešca eukariotskih bičeva.

Poslije Sagan razvija se preko 30 hipoteza s razlikama u detaljima, od kojih svaka pokušava dati svoje rješenje, svaka sa svojim prednostima i manama. Iako neke nastoje objasniti i postanak drugih organela, u središtu pozornosti ipak ostaju mitohondriji i plastidi. Iako kritizirana, Sagan je imala bitnu ulogu u oživljavanju teorije te je postavila temelje za daljnji razvoj endosimbiontskih teorija i time znatno pridonijela u potrazi za odgovorom na pitanje postanka eukariotske stanice.

3. MITOHONDRIJ I PORIJEKLO EUKARIOTSKIH OBILJEŽJA

Mitohondrij je stanični organel koji ima glavnu ulogu u proizvodnji energije, odnosno u snabdijevanju eukariotske stanice ATP-om. Dvostruka membrana te postojanje genetičkog materijala su glavna obilježja mitohondrija koja odaju njegovo endosimbiontsko porijeklo. Razvojem metoda u molekularnoj biologiji dolazi se do novih spoznaja te novijih formulacija endosimbiontske teorije. Ovdje ću navesti neke od istaknutijih i obrazloženijih teorija za koje smatram da bile bitne, dok je sveukupni pregled mnogobrojnih endosimbiontskih teorija prije i poslije pojave molekularnog sekvenciranja prikazan u radu Martina i sur. (2015).

Rane endosimbiontske teorije za mitohondrijskog domaćina često predlažu prokariotsku bakterijsku stanicu, kao što je primjer kod Lynn Margulis i Christiana de Duvea (Sagan, 1967; de Duve, 1969). Međutim, nakon otkrića treće domene života 1977. godine, zbog sličnosti između ribosoma, arheje su često smatrane domaćinom mitohondrija.

Kao što je Archibald naveo u svome radu iz 2014. godine, većina endosimbiontskih teorija se može svrstati pod dva fundamentalno različita modela: (1) oni koji tvrde da su glavna obilježja današnjih eukariota evoluirala prije endosimbioze mitohondrija te (2) oni prema kojima su i domaćin i endosimbiont prokariotskog porijekla, a eukariotska obilježja evoluirala su istodobno s mitohondrijem.

De Duve je poput Margulis smatrao da je ključni metabolički aspekt iskorištavanje kisika te je prema toj ideji proširio endosimbiontsku teoriju i na peroksisome (de Duve, 1969). Međutim, zbog nepostojanja genoma u peroksisomima te nedostatka dokaza, teorija je odbačena. U kasnijem radu iz 2007. godine predlaže da su glavna eukariotska obilježja, uključujući endocitozu i unutarstaničnu razgradnju nastala prva te da su imala ključnu ulogu u endosimbiozi (de Duve, 2007). Navedeni rad smatra se vodiljom za mikromutacijsku teoriju o porijeklu eukariotske stanice te pripada prvoj skupini modela. Iako u krivu što se tiče peroksisoma, de Duve se također smatra zaslužnim za prihvaćanje endosimbiontske teorije.

Jedna od najpoznatijih teorija s kraja 20. stoljeća je hipoteza *Archezoa* znanstvenika Cavalier-Smitha (Cavalier-Smith, 1983). *Archezoa* je naziv koji predstavlja skupinu eukariota kojima nedostaju mitohondriji te u radu Cavalier-Smith predlaže da su određene postojeće skupine anaerobnih prokariota 'živi fosili', smatrajući da su se navedeni organizmi odvojili od glavne eukariotske loze prije endosimbioze mitohondrija, ali nakon evolucije jezgre i citoskeleta (Cavalier-Smith, 1983). Kao i de Duve, Cavalier-Smith je također smatrao da je postojanje citoskeleta preduvjet za fagocitozni unos bakterijskog endosimbionta, iz kojeg je nastao mitohondrij. Navedena teorija se također može svrstati u prvu skupinu modela.

Godine 1998. znanstvenici Martin i Müller iznose teoriju pod nazivom hipoteza vodika (engl. *hydrogen hypothesis*) koja endosimbiozu temelji na metaboličkom aspektu i izmjeni metabolita između domaćina i simbionta. Hipoteza predlaže simbiotski odnos između anaerobne, metanogene arheje ovisne o vodiku kao domaćina i fakultativno anaerobne, heterotrofne α -proteobakterije kao endosimbionta. U odsutnosti kisika, α -proteobakterija je proizvodila vodik i ugljični dioksid kao metabolički otpad, a navedeno je služilo arheji u neposrednoj blizini kao izvor tvari potrebnih za anaboličke reakcije metanogeneze. U svrhu bolje i brže izmjene vodika, α -proteobakterija se konačno nastanila unutar arheje. Međutim, ne navodi se kako, ali se fagocitoza odbacuje kao mogućnost, budući da još nema razvijenog citoskeleta. Navedeno je dovelo do prijenosa gena iz endosimbionta u domaćina čime je nastao hipotetski primitivni eukariot bez jezgrine ovojnice, koji je imao

moгуćnost unositi organske molekule iz okoline u citosol te provoditi glikolizu. Specijalizacija te diferencijalna redukcija doveli su do aerobnih i anaerobnih oblika mitohondrija opisanih ranije (Martin i sur. 1998). Hipoteza vodika pripada drugoj skupini modela tvrdeći da su se eukariotska obilježja razvila tek nakon endosimbioze mitohondrija.

Znanstvenici Lopez-Garcia i Moreira (2006) predlažu sintrofični model u kojem nastoje objasniti endosimbiontsko porijeklo mitohondrija, ali i jezgre. Prema njihovoj hipotezi, koja uključuje tri člana, došlo je do endosimbioze između fermentirajuće, heterotrofne δ -proteobakterije, koja stvara vodik (domaćin) i metanogene, autotrofne arheje (jezgra). Simbiotski odnos temeljio se na sintrofiji i izmjeni vodika između arheje i δ -proteobakterije. Zadnji član njihove hipoteze je α -proteobakterija, koja je, kasnije okružena simbiotskim parom, postala mitohondrijski predak. Navedeni događaj doveo je do endosimbiontskog stanja sa metaboličkom kompartmentalizacijom kao selektivnim pritiskom kako bi se izbjeglo istovremeno postojanje anaboličkih (arheja) i kataboličkih (miksobakterija) puteva u stanici. Nakon što je formiran mitohondrij, arheja je izgubila svoja metanogena obilježja te se iz nje formira jezgra, što dovodi do nastanka proto-eukariota (Lopez-Garcia i sur. 2006). Navedena teorija je sintrofični model koji se može svrstati u drugu skupinu hipoteza, budući da domaćinu ne pripisuje eukariotska svojstva prije nastanka mitohondrija.

Autori Martijn i Ettema (2013) predlažu fagocitirajućeg arhealnog domaćina koji je progutao α -proteobakteriju. Prema navedenom modelu, arheja je tijekom vremena fagocitirala različite prokariote što je rezultiralo prijenosom i integracijom gena u njen kromosom. Kako bi se zaštitio vlastiti genetički materijal, uvrnućem je formirana membrana čime nastaje primitivna stanica s jezgrom. Takva stanica je naknadno progutala α -proteobakteriju te je uspostavljen endosimbiontski odnos između bakterije i arheje što je rezultiralo protomitohondrijalnim oblikom stanice. Ključan aspekt hipoteze Martijna i Etteme u suštini pripada prvoj skupini modela imajući bitne komponente zajedničke s teorijom Cavalier-Smitha i de Duvea, tvrdeći da su određena eukariotska obilježja prethodila mitohondriju.

Jedna od najrecentnijih endosimbiontskih teorija koja se pojavila je ona koja pokušava preciznije dati odgovor na to kako je točno postignut unos endosimbionata u citoplazmu domaćina. To je teorija „*inside-out*“ autora Davida i Buzza Bauma (2014). Oni predlažu blizak, neposredan odnos između α -proteobakterije i arheje čiju je površinu bakterija nastanjivala. Nastojeći povećati dodirnu površinu s epibiotskom bakterijom, a time i ubrzati

izmjenu metabolita, arheja je istiskivala membranom obavijena izbočenja izvan svoje stanične stijenke te polako obavijala simbionta. Navedenim procesom je postepeno formirana citoplazma oko proto-mitohondrija te su kao rezultat kasnije nastali jezgrina ovojnica, endoplazmatski retikulum i konačno kontinuirana plazmatska membrana.

Kao što je navedeno ranije, današnje endosimbiontske teorije se mogu uglavnom svrstati u dva modela: prvi model, koji predlaže da je domaćin koji je prethodio endosimbiozi već posjedovao eukariotska obilježja (koja je stekao npr. mutacijama) te drugi model, koji kaže da je domaćin bio prokariot te da su eukariotska obilježja i složenost eukariotske stanice uslijedila nakon endosimbioze (Archibald, 2014). Kod prve skupine modela postoji značajan broj problema te trenutni dokazi upućuju na ispravnost druge skupine. Jedna činjenica se izdiže kao ključna: količina energije dostupne za ekspresiju jednog gena u eukariota je znatno veća od one dostupne u prokariota (Lane i sur. 2010). Upravo je postojanje energetske biomembrane, koje su sposobne proizvoditi neusporedivo više energije u mitohondriju, omogućilo pretku eukariota stvaranje novih i jedinstvenih evolucijskih izuma, a time i 'skok' na eukariotsku razinu složenosti. I samo postojanje jezgre smatra se posljedicom endosimbioze mitohondrija o čemu će biti riječi u sljedećem poglavlju. Navedeno je razlog sveprisutnosti mitohondrija u eukariotima koji postanak mitohondrija smješta na sam početak evolucije eukariotske stanice te objašnjava zašto niti jedan prokariot nije mogao steći eukariotska obilježja prije mitohondrija jer mu je nedostajalo energije potrebne za taj 'skok' (Lane i sur. 2010; Lane 2014). Razlog zbog kojeg se dugo-popularna teorija *Archezoa* pokazala neispravna je taj što se za anaerobne eukariote koje navodi Cavalier-Smith ispostavilo da ipak imaju mitohondrije, iako reducirane (Embley i sur. 2002). To se dakako odnosi na mitosome i hidrogenosome. Jedina teorija koja uzima u obzir navedene strukture pripada drugoj skupini modela, a to je hipoteza vodika. Ta se teorija po svojim pretpostavkama pokazala kao najtočnija te daje najčvršće argumente o endosimbiontskom postanku eukariotske stanice predviđajući postojanje anaerobnih mitohondrija, hidrogenosoma i mitosoma (Slika 4b-d).

4. ENDOSIMBIONTSKI PRIJENOS GENA I POSTANAK JEZGRE

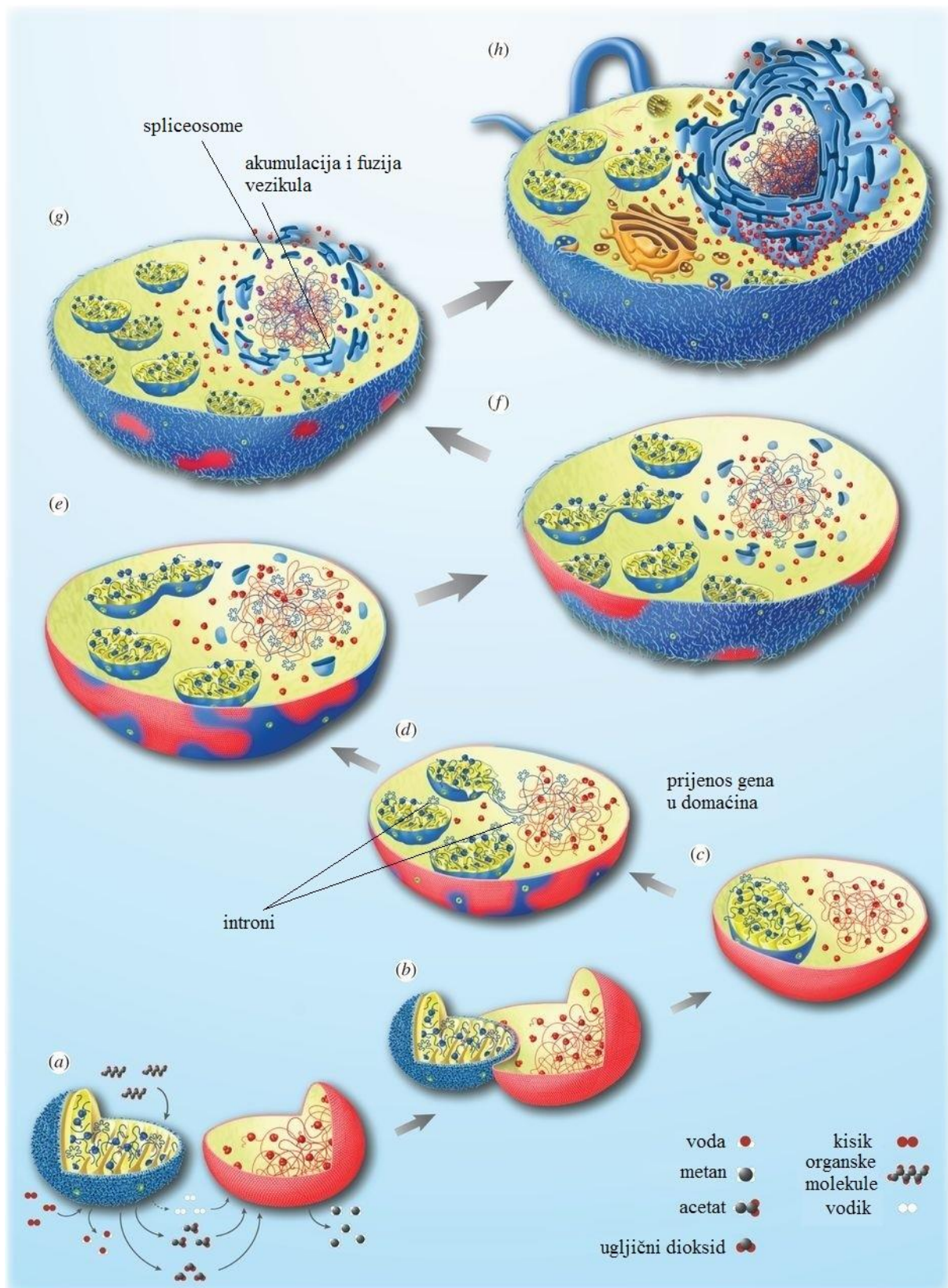
Jedno od glavnih obilježja eukariota, koje nije prisutno niti u jednom prokariotskom organizmu, jest jezgra, stanični odjeljak u kojem se nalazi većina genetičkog materijala organiziranog pomoću proteina u strukture koje se nazivaju kromosomi. Teorije vezane uz evoluciju jezgre obično se temelje na (1) uvrnućima plazmatske membrane u prokariotskoj stanici, (2) endosimbiozi između arheje i bakterijskog domaćina ili (3) autogenom porijeklu jezgrine ovojnice u arhealnom domaćinu nakon stjecanja mitohondrija (Martin i sur. 2015). Većina teorija o postanku jezgre predlaže njeno endosimbiontsko porijeklo i ukratko su sažete u radu Martin i sur. (2015). Te mnogobrojne teorije ovdje se neće navoditi iz razloga što postoji značajan broj problema vezan uz njih. One naime ne uspijevaju objasniti zašto je jezgra u osnovi toliko drugačija od bilo kojeg slobodno-živućeg prokariota sa stajališta (1) biosinteze ATP-a, koja u jezgri u potpunosti izostaje; (2) topologije membrane, koja se razlikuje od membrana svih ostalih slobodno-živućih prokariota; (3) permeabilnosti i povezanosti sa okolinom pomoću pora; i (4) diobe tijekom koje dolazi do privremene razgradnje jezgrine ovojnice (Martin i sur. 2015). Jezgra se kao takva znatno razlikuje od bilo kojeg postojećeg prokariota da bi joj se moglo pretpostaviti prokariotsko porijeklo. Izuzetno malen broj modela postanak jezgre povezuje s endosimbiozom mitohondrija. Model koji upravo to uzima u obzir jest hipoteza vodika temeljena na komparativnoj fiziologiji. Navedena teorija je trenutno najprihvaćenija, a navodi da je jezgra nastala pod selektivnim pritiskom kao posljedica postojanja introna (Martin i sur. 2006), a ne iz prokariotskih endosimbionata kao što većina ostalih teorija tvrdi, dok porijeklo jezgrine ovojnice (i endoplazmatskog retikuluma) povezuje s vezikulama bakterijskih lipida (Martin i sur. 1999). Međutim kako bi se razjasnio postanak jezgre, potrebno je prvo objasniti endosimbiontski prijenos gena s kojim je postanak jezgre usko povezan u ovoj teoriji.

Već je Wallin 1925. godine shvatio da je proces endosimbioze na određen način povezan s prijenosom gena iz simbionta u domaćina (Wallin, 1925). Tek nakon pojave molekularnog sekvenciranja njegova tvrdnja je dokazana. Martin i suradnici su 1993. godine na temelju analize genoma viših biljaka pokazali kimernost eukariotskih genoma te eubakterijsko porijeklo određenih gena i time potvrdili postojanje procesa koji se danas naziva endosimbiontski prijenos gena (Martin i sur. 1993). Najvjerojatniji način na koji se prijenos gena odvijao jest lizom organela usred stresa, nakon čega se genetički materijal mogao ugraditi u genom domaćina. Za prijenos gena je otkriveno da se mnogo većom

učestalošću od očekivane događa u današnjim eukariotima (Timmis i sur. 2004) te za navedeno postoje i dokazi u biljaka, gdje je primijećeno da blagi stres znatno povećava stopu prijenosa gena u jezgru (Wang i sur. 2012). Međutim, razlika je u ovom slučaju ta što je u ovom modelu domaćin još uvijek prokariot (arheja) koji ne posjeduje jezgru. Za prenesene gene postoje dva ishoda: mogu postati pseudogeni ili se eksprimirati kao citosolni proteini. Na taj način endosimbionti mogu prenijeti čitave metaboličke puteve iz organela u citoplazmu, kao što je to bio slučaj s glikolizom (Martin i sur. 1998).

Glavna pretpostavka ranije opisanog modela jest da je tijekom endosimbiontskog prijenosa gena došlo i do prijenosa introna iz simbionta u genom domaćina (Slika 3d). Model predlaže proširivanje introna grupe II kroz genom domaćina (Slika 3e) te njihovu postepenu pretvorbu u *spliceosomalne* introne putem spontanih mutacija (Slika 3g). Navedeno je stvorilo snažan selektivni pritisak za prostorno i vremensko razdvajanje prepisivanja i prevođenja, čime je domaćin izgubio jedno od glavnih prokariotskih obilježja (Martin i sur. 2006). Razlog tome je što je proces izrezivanja vrlo spor, dok je proces prevođenja relativno brz, zbog čega je došlo do potrebe stvaranja novog staničnog odjeljka u kojem će se odvijati prevođenje – citosola. Time se prepisanim molekulama mRNA omogućilo izrezivanje introna i pravilno sazrijevanje u odjeljku bez ribosoma, odnosno jezgri (Slika 3h). Jezgru od citoplazme odjeljuje jezgrina ovojnica koja je nastavak endoplazmatskog retikuluma te ju čini samo jedna preklopljena membrana, a ne dvostruka membrana kao što neke endosimbiontske teorije tvrde. Postanak endoplazmatskog retikuluma i jezgrine ovojnice pripisuje se fuziji vezikula sastavljenih od bakterijskih lipida (Slika 3g), za koje se smatra da su nastale sintezom u arhealnom citosolu kao posljedica prijenosa i ekspresije gena na putu biosinteze lipida te su postepeno agregirale stvarajući novi stanični odjeljak (Martin, 1999).

Iako hipoteza vodika uspijeva objasniti bitne probleme vezane uz postanak jezgre, neka pitanja još uvijek ostaju neodgovorena kao što su organizacija eukariotskog genoma, utišavanje ekspresije gena tijekom mitoze, postojanje otvorene i zatvorene mitoze te ostala brojna pitanja.



Slika 3. Postanak jezgre prema hipotezi vodika. Prilagođeno i preuzeto iz Martin i sur. (2015).

5. PLASTIDI I SEKUNDARNA ENDOSIMBIOZA

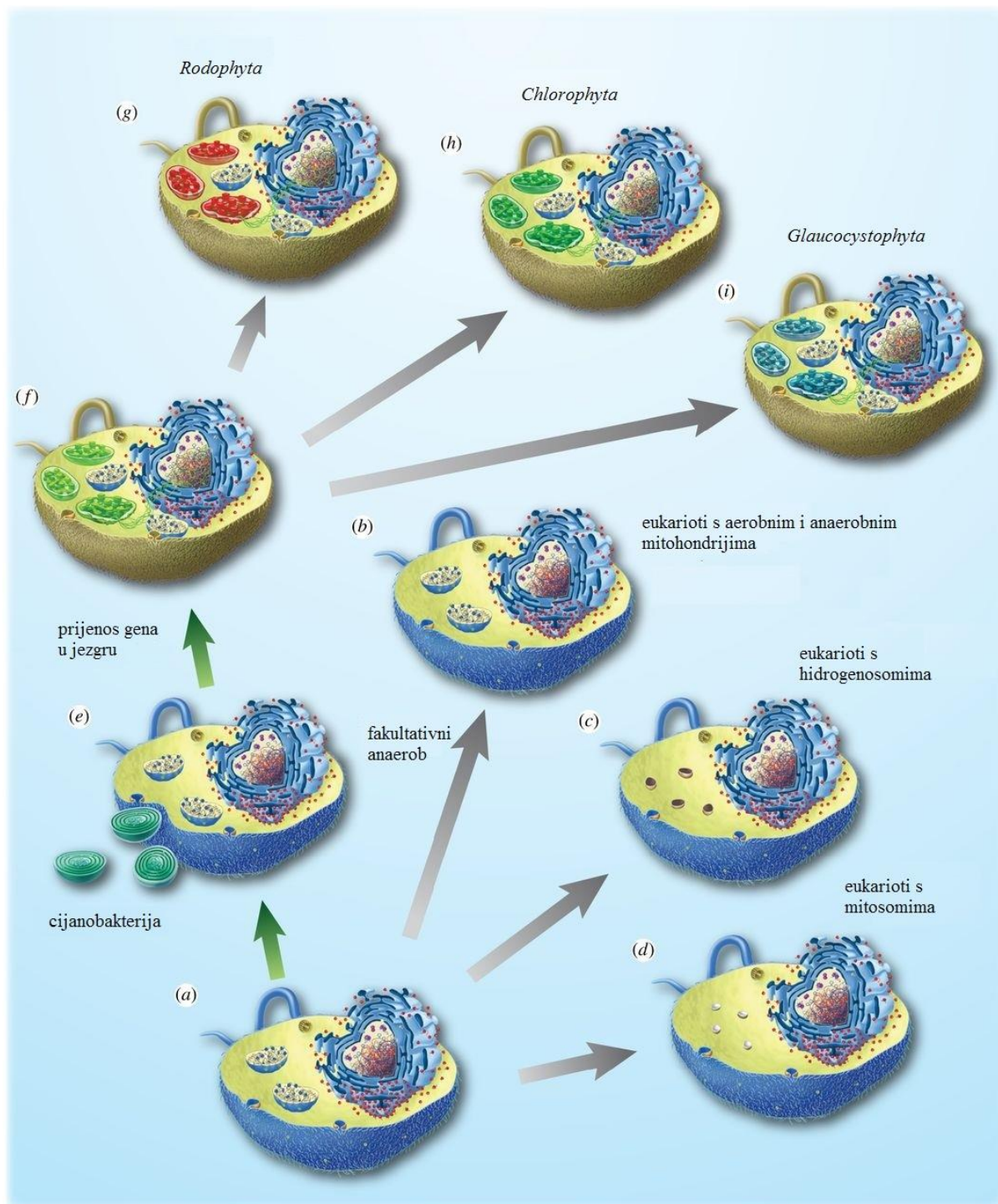
Plastidi su stanični organeli obavijeni dvostrukom membranom, karakteristični za biljke, alge te određene eukariotske skupine kao što su *Dinoflagellata*, *Euglenophyta* i *Apicomplexa*, a nastali su endosimbiotskim događajem iz cijanobakterije koja se nastanila u citoplazmi domaćina (Slika 4e). Uz fotosintezu imaju ulogu u velikom broju ostalih metaboličkih puteva kao što su fiksacija ugljika, biosinteza aminokiselina, lipida, kofaktora te metabolizam dušika. Upravo su ti metabolički aspekti ključni u pitanju porijekla plastida te se razlikuju u svakom od modela. Već je Mereschkowsky 1905. godine predložio da se endosimbiontski odnos između cijanobakterije i eukariotskog domaćina temelji na proizvodnji ugljikohidrata, dok Martin i Müller (1998) predlažu da bi uzrok endosimbiotskog odnosa mogao ležati u niskim koncentracijama molekularnog kisika u zraku za vrijeme endosimbioze te mogućnosti cijanobakterija da snabdijeva eukariotskog domaćina kisikom. Treći metabolički aspekt koji navode Deusch i suradnici (2008) mogao bi biti fiksacija dušika, svojstvo koje su današnji plastidi izgubili. Iako nema konkretnih dokaza za navedeni aspekt, analize genoma ukazuju na poveznicu između cijanobakterija koje fiksiraju dušik i pretka plastida (Deusch i sur. 2008).

Jedna od novijih hipoteza koja nastoji objasniti porijeklo plastida, a često se javlja u posljednjem desetljeću, je ona koja uključuje klamidiju. Nastojeći objasniti činjenicu da se endosimbioza primarnog plastida dogodila samo jednom tijekom evolucije, Ball i suradnici (2013) predlažu model u kojem je endosimbiotski odnos uzrokovan klamidijskom infekcijom domaćina. Prema njihovom modelu navedenu infekciju je izliječio cijanobiont (cijanobakterija), a klamidijalni patogen je pri tome preuzeo ulogu metaboličkog pomagača (Ball i sur. 2013). Iako popularna, hipoteza se s vremenom pokazala pogrešna. U radu iz 2014. godine u kojem Deschamps daje osvrt i povijesni pregled na navedeni trodijelni model primarne endosimbioze, ukazuje i na značajne probleme koji prate taj model. Najveći problem jest činjenica da filogenetska stabla na kojima se bazira trenutna teorija ne podupiru opisane tvrdnje, već se mogu interpretirati na jednostavnije načine koji ne zahtijevaju sudjelovanje niti jednog drugog simbionta osim cijanobakterije (Deschamps, 2014).

Za domaćina plastida je poznato da je bio punopravni eukariot što svi modeli i predlažu, međutim sa stajališta energetskog metabolizma novije spoznaje dovode do zaključka da je domaćin bio fakultativni anaerob (Martin i sur. 2015), na što ukazuje rasprostranjenost enzima potrebnih u anaerobnom metabolizmu kroz velik broj eukariotskih

skupina (Müller i sur. 2012). Međutim, pretka plastida je teško preciznije odrediti zbog horizontalnog prijenosa gena između prokariota. Filogenetske analize ukazuju na filamentozne cijanobakterije velikog genoma, koje su uz fotosintezu provodile i fiksaciju dušika (Ku i sur. 2014), što ide u prilog Deuscheovoj tvrdnji da je fiksacija dušika igrala ulogu u postanku plastida. Jedna stvar je sigurna, na što ukazuju i svi podatci: porijeklo plastida je monofiletsko, a smatra se da se navedeni endosimbiotski događaj dogodio prije otprilike 1,5 milijardi godina (Parfrey i sur. 2011), dok su najstariji pronađeni fosilni ostatci crvene alge *Bangiomorpha* stari 1,2 milijarde godina (Butterfield, 2000). Iz navedenog događaja su potekle tri različite linije: *Rodophyta*, *Chlorophyta*, iz kojih se razvijaju kopnene biljke i *Glaucocystophyta*, koji zadržavaju velik broj starih obilježja (Slika 4g-i). Iz značajnih razlika između triju skupina te navedenih podataka može se zaključiti da su se tri velike skupine algi s primarnim plastidima odvojile relativno rano u evoluciji plastida.

U eukariotskom svijetu postoje i organizmi čiji plastidi nisu okruženi samo dvostrukom membranom, već mogu biti obavijeni s tri ili čak četiri membrane. Takvi plastidi su nastali sekundarnom endosimbiozom: simbiozom između eukariotskog domaćina i eukariotske alge. Analize genskih stabala ukazuju da sekundarna endosimbioza nije monofiletski događaj te da se kroz evoluciju dogodila u više skupina neovisno, što je imalo velik utjecaj na raznolikost novonastalih skupina. Sekundarna endosimbioza se dogodila dva puta u skupini *Chlorophyta* te bar jednom u skupini *Rodophyta*. Nesigurnost u slučaju crvenih algi proizlazi iz nepodudarajućih podataka iz molekularne filogenije (Kim i sur. 2008) te se smatra kako je unos proteina u sekundarne plastide također imao bitnu ulogu u uspostavi sekundarne endosimbioze u navedenoj skupini, ali upravo taj aspekt ukazuje na samo jedan endosimbiontski događaj koji stoji na početku evolucije te skupine (Zimorski i sur. 2014).



Slika 4. Nastanak i razvoj endosimbionata. Preuzeto i prilagođeno iz Martin i sur. (2015).

6. GENOMI ORGANELA I USMJERAVANJE PROTEINA U ORGANELE

Bitan segment, koji je igrao ključnu ulogu u evoluciji organela, je usmjeravanje proteina u mitohondrije (i plastide), pojava koja se morala javiti kao nužnost uslijed endosimbiontskog prijenosa gena u jezgru, budući da se nakon toga znatan broj proteina potrebnih za funkciju organela sintetizirao na ribosomima u citosolu domaćina. Međutim, za navedeni proces je trebala postojati mašinerija koja će usmjeravati i unositi proteine u organele. Dio potrebne mašinerije, kao što su molekularni šaperoni i signalne peptidaze, preuzet je iz bakterijskog endosimbionta, dok je dio kao što su proteinske translokaze došao kao evolucijski izum, odnosno nastao *de novo* (Dolezal i sur. 2006). Evolucija sustava za unos proteina u organele nosi iznimno veliku važnost jer je omogućila genetičku integraciju endosimbionta i domaćina, dok je istovremeno dopustila očuvanje biokemijskog identiteta endosimbionta (Martin i sur. 2015).

Eukariotska jezgra kodira većinu mitohondrijskih (i plastidnih) proteina budući da se geni iz simbionta s lakoćom mogu prenijeti u genom domaćina te uz to ne postoje nikakve očite prepreke unosu prekursora proteina u organele. Unatoč tome, organeli su dio svojih genoma ipak zadržali. Odgovor na navedeni problem daje CoRR hipoteza (*co-location for redox regulation*) J.F. Allena (Allen, 2003; Allen, 2015). Preostali geni su oni koji kodiraju za ribosome organela te za proteine u bioenergetskom lancu prijenosa elektrona. CoRR hipoteza predlaže da su genomi organela zadržani kako bi se kolokalizirali u isti odjeljak kao i njihovi genski produkti. Razlog tome je što kolokalizacija navedenog omogućuje brzu i preciznu regulaciju ekspresije proteina potrebnih u lancu prijenosa elektrona. Ključan aspekt CoRR hipoteze jest održavanje redoks ravnoteže u organelu te je upravo *de novo* sinteza pod redoks kontrolom glavno obilježje proteina koji su kodirani i sintetizirani u mitohondrijima i plastidima (Allen, 2003). Smatra se da je do navedenog došlo pod selektivnim pritiskom, budući da je lanac prijenosa elektrona u bioenergetskim organelima za stanicu relativno riskantan biokemijski proces. Kako bi se izbjegla potencijalna oštećenja, nastala kao posljedica nedostatka ili nefunkcionalnosti nekih od proteina u lancu prijenosa elektrona (vjerojatno kisikovim radikalima) te kako navedeni osjetljivi biokemijski sustavi ne bi čekali na potrebne proteine iz citosola, bilo je nužno stvoriti sustav u kojem će organeli imati odlučujuću ulogu u regulaciji i sintezi dotičnih proteina. Jedna od glavnih prednosti CoRR hipoteze je što uspijeva objasniti nedostatak genoma u hidrogenosomima kojima nedostaje lanac prijenosa elektrona na unutarnjoj membrani. Već je navedeno da je održavanje redoks

ravnoteže selektivni pritisak zbog kojeg je genom zadržan u organelima. Prema tome, ako lanac prijenosa elektrona ne postoji, nema razloga zbog kojeg bi genom trebao biti prisutan u organelu, što je upravo i slučaj u hidrogenosomima (de Paula i sur. 2011).

CoRR hipoteza se u suštini usredotočuje isključivo na proteine u lancu prijenosa elektrona. Međutim, kao što je ranije navedeno, u genomu organela postoje i geni koji kodiraju za ribosomalne proteine te je nedavno otkrivena intrigantna činjenica vezana uz njih. Isti set ribosomalnih proteina je nezavisno zadržan u slučaju plastida i mitohondrija (Maier i sur. 2013). Objašnjenje tog fenomena leži u ograničenjima biosinteze ribosoma koja zahtijeva ekspresiju ribosomalnih proteina i rRNA molekula istovremeno, u istom staničnom odjeljku kako bi došlo do pravilnog sklapanja ribosoma te konačno i same translacije.

Endosimbiontski prijenos gena i evolucija mašinerije za usmjeravanje i unošenje proteina u mitohondrije i plastide rezultirala je značajnom ekspanzijom genetičkog sadržaja eukariotske jezgre, čime su preneseni geni dobili potrebnu razinu ekspresije i signale za usmjeravanje produkata natrag u organele iz kojih originalno potječu. Navedeno je istovremeno dovelo do redukcije genoma u organelima, ali se određen set gena prema CoRR hipotezi pod selektivnim pritiskom ipak morao zadržati.

7. ZAKLJUČAK

Od njenog utemeljenja početkom 20. stoljeća, endosimbiontska teorija je prošla kroz razdoblja odbacivanja i kritiziranja, ponovnog oživljavanja i konačno razdoblje eksplozivnog razvoja praćeno razvojem metoda u molekularnoj biologiji. Endosimbiontska teorija vrlo snažnim argumentima rasvjetljava porijeklo eukariotske stanice i njenih organela te dovodi u pitanje tradicionalnu reprezentaciju postanka eukariota 'stablom života' (engl. *Tree of Life*), predlažući novu reprezentaciju – *Ring of Life* prema kojoj je eukariotska domena života nastala kao rezultat spajanja arheja i bakterija (Baptiste i sur. 2005). Iako je dugogodišnji misterij postanka eukariota djelomično riješen, javljaju se brojna pitanja koja svoj odgovor tek čekaju, a endosimbiontska teorija će nedvojbeno biti ključna u potrazi za daljnjim odgovorima.

8. LITERATURA

- Allen, J.F. (2015). Why Chloroplasts and Mitochondria retain their own Genomes and genetic Systems: Colocation for Redox Regulation of Gene Expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), 10231-10238.
- Allen, J.F. (2003). The Function of Genomes in bioenergetic Organelles. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358(1429), 19-38.
- Archibald, J.M. (2015). Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution, *Current Biology*, 25(19), 911-921.
- Archibald, J.M. (2014). One plus One equals One: Symbiosis and the Evolution of complex Life. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Ball S.G., Subtil A., Bhattacharya D., Moustafa A., Weber A.P., Gehre L., Colleoni C., Arias M.C., Cenci U. i Dauvillée D. (2013). Metabolic Effectors secreted by bacterial Pathogens: essential Facilitators of plastid Endosymbiosis. *Plant Cell*, 25(1), 7-21.
- Bapteste E., i Walsh D.A. (2005). Does the 'Ring of Life' ring true?, *Trends in microbiology*, 13(6), 256-261.
- Baum, D.A. i Baum, B. (2014). An inside-out Origin for the eukaryotic Cell. *BMC Biology*, 12, 76.
- Butterfield, N.J. (2000). *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: Implications for the Evolution of Sex, Multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic Radiation of Eukaryotes. *Paleobiology*, 26(3), 386–404.
- Cavalier-Smith T. (1983). A 6-kingdom Classification and a unified Phylogeny. In: Schenk HEA, Schwemmler W, (ed.), *Endocytobiology II: Intracellular space as oligogenetic ecosystem*. Berlin: Walter de Gruyter; 1027–1103.
- De Paula, W.B.M, Allen J.F. i van der Giezen, M. (2011). Mitochondria, Hydrogenosomes and Mitosomes in Relation to the CoRR Hypothesis for Genome Function and Evolution, *Organelle Genetics*, 105-119.
- De Duve, C. (2007). The Origin of Eukaryotes: a Reappraisal. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 395-403.

- De Duve, C. (1969). Evolution of the Peroxisome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 168, 369–381.
- Deschamps, P. (2014). Primary Endosymbiosis: Have Cyanobacteria and Chlamydiae ever been Roommates? *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 83(4), 291–302.
- Deusch, O., Landan, G., Roettger, M., Gruenheit, N., Kowallik, K.V., Allen, J.F., Martin, W., i Dagan, T. (2008). Genes of Cyanobacterial Origin in Plant Nuclear Genomes Point to a Heterocyst-forming Plastid Ancestor. *Molecular Biology and Evolution*, 25(4), 748-761.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. i Lithgow, T. (2006). Evolution of the Molecular Machines for Protein Import into Mitochondria, *Science*, 313(5785), 314-318.
- Embley, T.M., van der Giezen, M., Horner, D.S., Dyal, P.L. i Foster, P.G. (2003). Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358(1429), 191-203.
- Garg, S., Zimorski, V. i Martin, W.F. (2016). Endosymbiotic Theory. In: Kliman RM (ed.) *The Encyclopedia of Evolutionary Biology*, Vol. 1. Academic Press, Oxford, 511–517.
- Kim, E. i Graham, L.E. (2008). EEF2 Analysis Challenges the Monophyly of Archaeplastida and Chromalveolata, *PLOS ONE*, doi: 10.1371/journal.pone.0002621.
- Ku, C., Roettger, M., Zimorski, V., Nelson-Sathi, S., Sousa, F. i Martin, W. (2014). Plastid Origin: who, when and why?. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 83(4), 281-289.
- Lane, N. i Martin, W. (2010). The Energetics of Genome Complexity. *Nature*, 467, 929-934.
- López-García, P. i Moreira, D. (2006). Selective Forces for the Origin of the Eukaryotic Nucleus. *Bioessays*, 28(5), 525-533.
- Maier, U.G., Zauner, S., Woehle, C., Bolte, K., Hempel, F., Allen, J.F. i Martin, W.F. (2013). Massively convergent Evolution for ribosomal Protein Gene Content in Plastid and Mitochondrial Genomes, *Genome Biology and Evolution*, 5(12), 2318-2329.
- Margulis, L., Dolan, M. i Guerrero, R. (2000). The Chimeric Eukaryote: Origin of the Nucleus from the Karyomastigont in amitochondriate Protists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 6954–6959.

- Martijn, J. i Ettema, T. (2013). From Archaeon to Eukaryote: The evolutionary Dark Ages of the eukaryotic Cell. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 451-457.
- Martin, W., Garg, S. i Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic Theories for Eukaryote Origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370.
- Martin, W. i Koonin, E. V. (2006). Introns and the Origin of Nucleus-Cytosol Compartmentalization. *Nature* 440 (7080), 41-45.
- Martin, W. i Kowallik, K. (1999). Annotated English Translation of Mereschowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche'. *European Journal of Phycology*, 34(3), 287-295.
- Martin, W. (1999). A briefly argued Case that Mitochondria and Plastids are Descendants of Endosymbionts, but that the Nuclear Compartment is not, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1426).
- Martin, W. i Muller, M. (1998). The Hydrogen Hypothesis for the First Eukaryote. *Nature*, 392, 37-41.
- Martin, W., Brinkmann, H., Savonna, C., i Cerff, R. (1993). Evidence for a Chimeric Nature of Nuclear Genomes: Eubacterial Origin of Eukaryotic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(18), 8692-8696.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S., Yu, R., van der Giezen, M., Tielens, A. i Martin, W. (2012). Biochemistry and Evolution of anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 444-495.
- Parfrey, L., Lahr, D., Knoll, A. i Katz, L. (2011). Estimating the Timing of early Eukaryotic Diversification with Multigene Molecular Clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33).
- Sagan, L. (1967). On the Origin of Mitosing Cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14, 225-274.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang C.Y. i Martin, W. (2014). Endosymbiotic Gene Transfer: Organelle Genomes forge Eukaryotic Chromosomes, *Nature Reviews Genetics*, 5, 123-135.

- Wallin, I. E. (1925). On the Nature of Mitochondria: Demonstration of the Bacterial Nature of Mitochondria. *American Journal of Anatomy*, 36, 131-149.
- Wallin, I. E. (1927). Symbiontism and the Origin of Species. In: London: Bailliere, Tindall and Cox.
- Wang, D., Lloyd, A.H. i Timmis J.N. (2012). Environmental Stress increases the Entry of cytoplasmic organellar DNA into the Nucleus in Plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2444–2448.
- Zimorski, V., Ku, C., Martin, W.F. i Gould, S.B. (2014). Endosymbiotic Theory for Organelle Origins. *Current Opinion in Microbiology*, 22, 38-48.
- <https://www.nature.com/scitable/content/the-origin-of-mitochondria-and-chloroplasts-14747702>

9. SAŽETAK

Pitanje postanka eukariotske stanice ključno je pitanje u evoluciji kompleksnog života. Teorija koja najvjernije objašnjava njeno porijeklo je teorija endosimbioze koja eukariotskim organelima pripisuje prokariotsko porijeklo tvrdeći da su se mitohondriji i kloroplasti razvili iz endosimbionata, tvrdnja koja se danas smatra općim znanjem. U slučaju mitohondrija dokazi čvrsto upućuju na α -proteobakteriju, dok se domaćinu na temelju citoplazmatskih ribosoma pretpostavlja arhealno porijeklo. Endosimbioza mitohondrija ključan je događaj u postanku eukariotske stanice jer je omogućila nastanak eukariotskih obilježja koja su se razvila s visokom energetsom cijenom, te se usko povezuje s nastankom jezgre i endoplazmatskog retikuluma. Za domaćina plastida je općeprihvaćeno da je već bio eukariotske organizacije, a filogenetske analize pretka plastida svrstavaju među cijanobakterije sa sposobnošću fiksacije dušika, metabolički aspekt za koji se smatra da je posredovao u endosimbiozi plastida. Bitan proces koji je omogućio integraciju simbionata je endosimbiontski prijenos gena, proces kojim je simbiot transformirao domaćina iz perspektive energetskog metabolizma namećući mu heterotrofnu ishranu. Kao nužnost se tada javlja i mašinerija za usmjeravanje i unos proteina u organele, čime je organelima dopušteno zadržavanje vlastitog biokemijskog identiteta. Unatoč prijenosu gena i unosu proteina u organele, dio genoma se pod selektivnim pritiskom ipak zadržao u organelima kao posljedica potrebe regulacije sinteze proteina u lancu prijenosa elektrona. Iako velik broj pitanja vezanih uz eukariotsku stanicu još uvijek ostaje nerazjašnjen, iz navedenog je vidljivo da teorija endosimbioze igra ključnu ulogu u potrazi za eukariotskim porijeklom te uz alate molekularne biologije daje odgovore na brojne probleme i fenomene vezane uz postanak organela i eukariotskih obilježja.

10. SUMMARY

The main question regarding the evolution of complex life on Earth is by far the one related to the origin of eukaryotic cell. The theory providing the most credible answers regarding the origin of eukaryotic cell is endosymbiotic theory, which claims that organelles such as mitochondria and plastids evolved from prokaryotic endosymbionts, claim that is now regarded as common knowledge. In the case of mitochondria, evidence firmly point toward an α -proteobacterial ancestor, whilst its host is believed to be of archeal origin, owing to the fact that eukaryotes and archaea possess similar ribosomes in their cytosol. The uptake of mitochondria is a crucial endosymbiotic event set at the very beginning of eukaryotic lineage, because it allowed eukaryotes to attain their novel properties which came at high energetic price. While the nature of the host that acquired plastids was undoubtedly that of a eukaryote, the plastidial predecessor that came to reside inside its host is believed to belong to a group of nitrogen-fixing cyanobacteria. The nitrogen fixation itself is thought to be the key metabolic aspect which mediated the symbiosis of cyanobacteria. Essential process that allowed integration of the symbionts was endosymbiotic gene transfer, the same process that transformed the host into heterotrophic from the perspective of energy metabolism. Protein import and protein targeting then come forth as necessary, allowing the organelles to maintain their biochemical identity. Despite of gene transfer and protein import, under selective pressure eukaryotic organelles still retained parts of their genomes, in order to regulate the *de novo* synthesis of proteins involved in electron transport chain. Although a vast number of questions regarding eukaryotic cell still remains unanswered, it is evident that endosymbiotic theory plays a significant role in the pursuit of the eukaryotic origin. Combined with the tools of molecular biology, it provides distinct explanations to numerous problems and phenomena associated with the origin of organelles and eukaryotic properties.